

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

30. Juni 1998

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)**Bescheinigung**

Die ASAT AG Applied Science & Technology in Zug/Schweiz hat
eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Rekombinante Antikörper"

am 12. Dezember 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht und
erklärt, daß sie dafür die Innere Priorität der Anmeldung in
der Bundesrepublik Deutschland vom 6. Juni 1997, Aktenzeichen
197 23 904.8, in Anspruch nimmt.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole
C 12 N, C 07 H und C 07 K der Internationalen Patentklassi-
fikation erhalten.

München, den 15. Juni 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

rüne

Zeichen: 197 55 227.7

PATENTANWÄLTE

DIPL.-ING. **H. WEICKMANN**
DIPL.-ING. **F. A. WEICKMANN**
DIPL.-CHEM. **B. HUBER**
DR.-ING. **H. LISK**
DIPL.-PHYS. DR. **J. PRECHTEL**
DIPL.-CHEM. DR. **B. BÖHM**
DIPL.-CHEM. DR. **W. WEISS**
DIPL.-PHYS. DR. **J. TIESMEYER**
DIPL.-PHYS. DR. **M. HERZOG**

POSTFACH 860 820
81635 MÜNCHEN

KOPERNIKUSSTRASSE 9
81679 MÜNCHEN

TELEFON (089) 4 55 63-0
TELEX 5 22 621

TELEFAX (089) 4 70 50 68

eMail weickmann@compuserve.com

12. Dez. 1997

Unser Zeichen:
16824P DE-1/WWvo

eingefügt

Anmelder:
ASAT AG
Applied Science & Technology
Baarerstrasse 77

6302 Zug
Schweiz

Rekombinante Antikörper

R kombinante Antikörper

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft neue Nukleinsäuresequenzen, die für humane Autoantikörper gegen Blutplättchen-Membranproteine und für antiidiotypische Antikörper kodieren, neue Aminosäuresequenzen von humanen Antikörpern und deren Verwendung für die Diagnostik und Therapie von Krankheiten.

10

15

Autoimmun-thrombozytopenische Purpura (AITP) ist eine Immunkrankheit, die durch eine geringe Blutplättchenzahl bei normaler oder gesteigerter Megakaryozytopoiese definiert ist. Aufgrund des Vorhandenseins von Anti-Plättchen-Autoantikörpern findet eine verstärkte Zerstörung von Plättchen im reticuloendothelialen System (Milz, Leber, Knochenmark) statt. Diese Autoantikörper, die in etwa 75% der AITP Patienten nachgewiesen werden können, sind überwiegend gegen die Plättchenmembran-Glykoproteine (GP) IIb/IIIa und Ib/IX gerichtet. In einem einzigen Patienten können mehrere verschiedene Auto-Antikörper-Spezifitäten gefunden werden (vgl. z.B. Berchtold und Wenger, Blood 81 (1993), 1246-1250; Kiefel et al., Br. J. Haematol. 79 (1991), 256-262; McMillan et al., Blood 70 (1987), 1040 und Fujisawa et al., Blood 79 (1991); 1441). Die Charakterisierung von Bindeepitopen und die Ermittlung der pathogenetischen Signifikanz der Autoantikörper bleibt jedoch schwierig aufgrund der beschränkten Menge an Autoantikörpern, die aus AITP Patienten erhältlich sind. Unter Verwendung der Hybridomatechnik konnten nur wenige humane monoklonale Antikörper aus Lymphozyten von AITP Patienten erhalten werden, die mit GPIIb/IIIa reagieren (Kunicki et al., Hum. Antibodies Hybridomas 1 (1990), 83-95).

20

25

30

Auch bei gesunden Personen wurde das Auftreten natürlicher Autoantikörper gegen verschiedene Selbstantigene berichtet, beispielsweise gegen intrazelluläre und zytoskelettale Komponenten humaner Plättchen (Guilbert et al., J. Immunol. 128 (1982), 2779-2787; Hurez et al., Eur. J. Immunol. 23 (1993), 783-789 und Pfueller et al., Clin. Exp. Immunol. 79 (1990), 367-373). Einige dieser im Serum gesunder Personen beobachteten Autoantikörper können auch gegen Plättchenmembranproteine gerichtet sein (Souberbielle, Eur. J. Haematol. 56 (1996), 178-180). Die Rolle dieser natürlichen Autoantikörper sowie ihre Beziehung zu Krankheits-assoziierten Autoantikörpern ist jedoch noch unbekannt.

Zur Behandlung von AITP können Corticosteroide eingesetzt werden. Etwa die Hälfte der Patienten reagiert auf eine Verabreichung von Prednison innerhalb von 4 Wochen, Langzeitremissionen werden jedoch nur selten gefunden. Bei Patienten, die starke Blutungen oder extrem geringe Plättchenzahlen aufweisen, wird als Notfallbehandlung die Verabreichung hoher Dosen von intravenösem Immunglobulin (IVIgG) empfohlen. Nach dieser Behandlung folgt ein schneller, aber üblicherweise nur vorübergehender Anstieg der Plättchenzahl bei den meisten Patienten. Die Wirkmechanismen von Corticosteroiden sowie von IVIgG bei der Behandlung der AITP sind noch unbekannt. Durch Untersuchungen von Berchtold et al., (Blood 74 (1989), 2414-2417 und Berchtold und Wenger, Blood 81 (1993), 1246-1250) ist bekannt, daß die Bindung von Autoantikörpern an Plättchen-Glykoproteine durch antiidiotypische Antikörper in IVIgG gehemmt werden kann.

Das der vorliegenden Anmeldung zugrundeliegende Problem besteht darin, neue DNA Sequenzen zu identifizieren, welche für die Bindung von Autoantikörpern an GPIIb/IIIa verantwortlich sind. Auf diese Weise können neue pharmazeutische Präparate bereitgestellt werden, welche zur Verbesserung der Diagnose und Therapie von AITP eingesetzt werden können.

Die Identifizierung von Bindesequenzen aus Autoantikörpern gelang überraschenderweise nach Herstellung einer kombinatorischen Phagemid-Displaybibliothek von schweren und leichten Ketten humaner Antikörper unter Verwendung peripherer zirkulierender B-Zellen eines gesunden humanen Spenders. Nach Präsentation humaner schwerer und leichter Antikörper Fab-Fragmente an der Oberfläche des filamentösen Phagen M13 konnten Phagen-Klone identifiziert werden, welche eine spezifische Bindung an GPIIb/IIIa zeigen.

Hierzu wurde die Phagemid-Bibliothek aufeinanderfolgend mit thrombasthenischen Plättchen ohne GPIIb/IIIa (negative Selektion) und normalen Plättchen (positive Selektion) in Kontakt gebracht. Nach mehreren Runden der Selektion und Amplifikation durch Infektion von E.coli wurden 23 Klone erhalten, die an den GPIIb/IIIa Komplex binden können. Inhibierungsstudien unter Verwendung Pools monoklonaler Antikörper gegen GPIIb/IIIa ergaben zwei Gruppen von Klonen: Beide Gruppen wurden durch monoklonale Antikörper, die spezifisch für den GPIIb/IIIa Komplex waren, inhibiert, und eine Gruppe auch durch einen GPIIb spezifischen monoklonalen Antikörper. Diese Befunde wurden durch DNA-Analyse der Klone bestätigt, die das Vorhandensein von 2 unterschiedlichen Anti-GPIIb/IIIa Phagen-Klonen ergab. Diese Ergebnisse zeigen, daß 2 GPIIb/IIIa spezifische Phagen-Klone, d.h. Autoantikörper, aus dem Genom einer gesunden Person kloniert werden können und daß diese Klone Konformationsepitope des GPIIb/IIIa Komplexes erkennen können. Durch Inhibierungsstudien wurde weiterhin festgestellt, daß beide Phagen-Klone die Bindung von Plättchen-assoziierten Autoantikörpern aus Patienten mit AITP an gereinigtes GPIIb/IIIa hemmen und somit vermutlich AITP-assoziierte Epitope von GPIIb/IIIa erkennen. Da die Phagen-Klone die Antigenbindesequenzen natürlicher Autoantikörper enthalten, die aus dem Genom einer gesunden Person stammen, kann dieser Befund zu neuen Erkenntnissen über den Ursprung Plättchen-assoziiierter Autoantikörper in AITP führen.

Darüber hinaus ist es unter Verwendung der erfindungsgemäßen Phagen-Klone möglich, rekombinante antiidiotypische Antikörper gegen Anti-GPIIb/IIIa Autoantikörper zu erzeugen, wobei die Anti-GPIIb/IIIa Phagen-Klone als Antigen verwendet werden. Die auf diese Weise erhältlichen
5 rekombinanten antiidiotypischen Antikörper stellen eine interessante klinische Alternative zur Verwendung von IVIgG dar.

Die Nukleotid- und davon abgeleitete Aminosäuresequenzen der identifizierten Phagen-Klone sind in den Sequenzprotokollen SEQ ID No.1 bis 8
10 (Autoantikörper) bzw. SEQ ID No. 9 bis 18 (antiidiotypische Antikörper) dargestellt.

I. Autoantikörper

15 Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für Autoantikörper kodieren. Ein Gegenstand der Erfindung ist somit eine Nukleinsäure, die für die schwere Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

20 (a) einer für die Aminosäuresequenz:

V L P F D P I S M D V (I)

kodierenden Nukleotidsequenz,

(b) einer für die Aminosäuresequenz:

A L G S W G G W D H Y M D V (II)

25 kodierenden Nukleotidsequenz,

(c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert und

(d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
30 einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIIb/IIIa kodiert.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure umfaßt weiterhin vorzugsweise eine CDR1-Region ausgewählt aus

(a) einer für die Aminosäuresequenz:
G Y S W R (III)

5 kodierenden Nukleotidsequenz,

(b) einer für die Aminosäuresequenz:
S Y A M H (IV)

(c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
10 einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise
mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b)
kodiert.

Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure weiterhin eine
15 CDR2-Region ausgewählt:

(a) einer für die Aminosäuresequenz:
D I S Y S G S T K Y K P S L R S (V)
kodierenden Nukleotidsequenz,

(b) einer für die Aminosäuresequenz:
20 V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G (VI)
kodierenden Nukleotidsequenz und

(c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von
mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b)
25 kodiert.

Ein zweiter Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für
die leichte Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder
ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

30 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
A T W D D G L N G P V (VII)

kodierenden Nukleotidsequenz,

- (b) einer für die Aminosäuresequenz:

A A W D D S L N G W V

(VIII)

kodierenden Nukleotidsequenz,

- 5 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert und

- 10 (d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIIb/IIIa kodiert.

Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure weiterhin eine CDR1-Region ausgewählt aus:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:

15 S G S S S N I R S N P V S

(IX)

kodierenden Nukleotidsequenz,

- (b) einer für die Aminosäuresequenz:

S G S S S N I G S N T V N

(X)

kodierenden Nukleotidsequenz und

- 20 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

25 Darüber hinaus umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure vorzugsweise weiterhin eine CDR2-Region ausgewählt aus:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:

G S H Q R P S

(XI)

kodierenden Nukleotidsequenz,

- 30 (b) einer für die Aminosäuresequenz:

S N N Q R P S

(XII)

kodierenden Nukleotidsequenz und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise mindestens 90 % zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

5

II. Antiidiotypische Antikörper

Ein zweiter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für antiidiotypische Antikörper kodieren. Ein Gegenstand der Erfindung ist somit
10 eine Nukleinsäure, die für die schwere Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert, und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
V R D L G Y R V L S T F T F D I (XIII)
15 kodierenden Nukleotidsequenz,
- (b) einer für die Aminosäuresequenz:
D G R S G S Y A R F D G M D V (XIV)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (c) einer für die Aminosäuresequenz:
20 M G S S V V A T Y N A F D I (XV)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (d) einer für die Aminosäuresequenz:
D A D G D G F S P Y Y F P Y (XVI)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- 25 (e) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a), (b), (c) oder (d) kodiert und
- (f) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
30 einer äquivalenten Bindefähigkeit an Autoantikörper gegen GPIIb/IIIa kodiert.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure umfaßt weiterhin vorzugsweise eine CDR1-Region ausgewählt aus: einer für die in Tab. 7 gezeigten Aminosäuresequenzen N F A M S, S Y T M H oder D Y A L H, S H Y W S kodierenden Nukleotidsequenz und einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise mindestens 90% zu einer der zuvor genannten Aminosäuresequenzen kodiert.

Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure weiterhin eine CDR2- Region ausgewählt aus einer für die in Tab. 7 gezeigten Aminosäuresequenzen G I S G G G L L T H Y A (D/N) S V K G, L I S Y D G S N K Y Y A D S V K G, G I S W D S T S I G Y A D S V K G oder F I Y D G A R T R F N P S L R S kodierenden Nukleotidsequenz und einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens 90% zu einer der zuvor genannten Aminosäuresequenzen kodiert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für die leichte Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz

C S Y V H S S T N

(XVII)

kodierenden Nukleotidsequenz,

- (b) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) kodiert und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Bindefähigkeit an Autoantikörper gegen GPIIb/IIIa kodiert.

Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure weiterhin eine CDR1-Region ausgewählt aus einer für die in Tab. 7 gezeigte Aminosäuresequenz T G T S S A I G N Y N F V P kodierenden Nukleotidsequenz und einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens 90% zur der
5 zuvor genannten Aminosäuresequenz kodiert.

Darüber hinaus umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure vorzugsweise weiterhin eine CDR2-Region ausgewählt aus einer für die in Tab. 7 gezeigte
10 Aminosäuresequenz E G S K R P S kodierenden Nukleotidsequenz und einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise mindestens 90% zu der zuvor genannten Aminosäuresequenz kodiert.

Unter dem Begriff "funktionelles Derivat einer Kette eines humanen Antikörpers" im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid zu verstehen, das mindestens eine CDR3-Region der schweren oder/und leichten Kette wie vorstehend definiert umfaßt und zusammen mit der jeweiligen komplementären Kette des humanen Antikörpers (oder einem
20 Derivat einer solchen Kette) ein Antikörperderivat bilden kann, das eine äquivalente Erkennungsspezifität für ein Antigen wie der nicht derivatisierte Antikörper besitzt. Vorzugsweise weist ein derartiges Antikörperderivat eine Bindungskonstante von mindestens 10^{-6} l/mol, vorzugsweise von mindestens 10^{-8} l/mol für das jeweilige Antigen auf.

25 Die Herstellung funktioneller Derivate von Ketten eines humanen Antikörpers kann beispielsweise durch Deletion, Substitution oder/und Insertion von Abschnitten des für das jeweilige Polypeptid kodierenden Gens durch rekombinante DNA-Techniken erfolgen.

30 Besonders bevorzugte funktionelle Derivate von Antikörperketten oder Antikörper sind Einzelkettenantikörper, die beispielsweise aus den variablen

Domänen der H- und L-Kette sowie gegebenenfalls einer konstanten Domäne zusammengesetzt sein können. Die Herstellung solcher Konstrukte ist bei Hoogenboom et al., Immunol. Rev. 130 (1992), 41-68; Barbas III, Methods: Companion Methods Enzymol. 2 (1991), 119 und Plückthun, 5 Immunochemistry (1994), Marcel Dekker Inc., Kapitel 9, 210-235 beschrieben.

Unter dem Begriff "äquivalente Bindefähigkeit" im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine gleiche Bindeaffinität oder/und Spezifität, d.h. Epi- 10 toperkennung wie in den konkret offenbarten Sequenzen zu verstehen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure enthält. Dieser Vektor kann ein prokaryontischer Vektor oder ein eukaryontischer 15 Vektor sein. Beispiele für prokaryontische Vektoren sind Plasmide, Cosmide und Bakteriophagen. Derartige Vektoren sind beispielsweise bei Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, in den Kapiteln 1 bis 4 ausführlich beschrieben. Vorzugsweise ist ein prokaryontischer Vektor ein Plasmid oder 20 ein Phage.

Andererseits kann der Vektor auch ein eukaryontischer Vektor sein, z.B. ein Hefektor, ein Insektenvektor (Baculovirus) oder ein Säugervektor (Plasmidvektor oder viraler Vektor). Beispiele für eukaryontische Vektoren 25 sind bei Sambrook et al., supra, Kapitel 16 und Winnacker, Gene und Klone, Eine Einführung für die Gentechnologie (1985), VCH Verlagsgesellschaft insbesondere Kapitel 5, 8 und 10, beschrieben.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle, die 30 eine erfindungsgemäße Nukleinsäure exprimiert, oder eine Zelle, die mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder mit einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert ist. Die Zelle kann eine prokaryontische Zelle (z.B. eine

gram-negative Bakterienzelle, insbesondere E.coli) oder eine eukaryontische Zelle (z.B. eine Hefe-, Pflanzen- oder Säugerzelle) sein. Beispiele für geeignete Zellen und Verfahren zum Einführen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in derartige Zellen finden sich den obigen Literaturstellen.

5

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid, das von einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure kodiert ist, insbesondere ein rekombinantes Polypeptid. Besonders bevorzugt enthält das Polypeptid die variable Domäne der H- oder/und L-Kette eines humanen Antikörpers.

10

Besonders bevorzugt ist ein Polypeptid, das Antikörpereigenschaften aufweist und aus einer schweren Kette oder einem funktionellen Derivat davon sowie aus einer leichten Kette oder einem funktionellen Derivat davon als Untereinheiten aufgebaut ist. Das Polypeptid kann aus zwei separaten Ketten zusammengesetzt sein oder als Einzelkettenpolypeptid vorliegen.

15

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Antikörper gegen ein erfindungsgemäßes Polypeptid, der gegen ein für die Erkennung des Antigens verantwortliche Region des Polypeptids gerichtet ist. Dieser Antikörper kann ein polyklonales Antiserum, ein monoklonaler Antikörper oder ein Fragment eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers (z.B. ein Fab-, $F(ab)_2$ -, Fab'- oder $F(ab')_2$ Fragment) sein. Vorzugsweise ist der Antikörper gegen die CDR3-Region der schweren oder/und leichten Antikörperkette des erfindungsgemäßen Polypeptids oder einen Bereich davon gerichtet. Derartige Antikörper können nach an sich bekannten Methoden durch Immunisierung eines Versuchstiers mit einem Peptid oder Polypeptid, welches eine erfindungsgemäße CDR3-Region enthält, und Gewinnung der resultierenden polyklonalen Antikörper aus dem Versuchstier erhalten werden. Weiterhin können monoklonale Antikörper durch Fusion einer Antikörper-produzierenden B-Zelle des Versuchstiers mit einer Leukämiezelle nach der Methode von Köhler und Milstein oder einer Weiterentwicklung davon erhalten werden. Darüber hinaus können

20

25

30

rekombinante Antikörper, die gegen die CDR3-Region des erfindungsgemäßen Polypeptids gerichtet sind, auch durch Musterung einer geeigneten Phagemid-Bibliothek, z.B. einer Phageiraid-Bibliothek aus einem gesunden humanen Spender, erhalten werden, wobei als Antigen ein erfindungsgemäßes Polypeptid verwendet wird.

Die Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Nukleinsäure, einen Vektor, ein Polypeptid, einen Antikörper oder eine Zelle wie zuvor genannt, als aktive Komponente, gegebenenfalls zusammen mit anderen aktiven Komponenten sowie pharmazeutisch üblichen Hilfs-, Zusatz- oder Trägerstoffe enthält.

Die pharmazeutische Zusammensetzung kann zur Herstellung eines diagnostischen oder therapeutischen Mittels eingesetzt werden. Beispiele für diagnostischen Anwendungen sind die Diagnose von AITP oder einer Prädisposition für AITP. Eine weitere bevorzugte diagnostische Anwendung ist die Überwachung des Krankheitsverlaufs bei AITP.

Der Einsatz der pharmazeutischen Zusammensetzung als diagnostisches Mittel kann beispielsweise den Nachweis einer B-Zellsubpopulation umfassen, welche ein erfindungsgemäßes Polypeptid als Antikörper exprimiert. Der Nachweis dieses Antikörpers kann beispielsweise auf Nukleinsäureebene, z.B. durch einen Nukleinsäure-Hybridisierungs-Assay gegebenenfalls mit vorgeschalteter Amplifikation erfolgen. Andererseits kann der Nachweis auch auf Proteinebene durch einen Immunoassay unter Verwendung von spezifisch mit dem Polypeptid reagierenden Antigenen oder Antikörpern erfolgen.

Weiterhin kann die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung auch auf therapeutischem Gebiet angewandt werden, insbesondere zur Prävention oder Therapie von AITP. Diese therapeutische Anwendung kann beispielsweise darauf beruhen, daß eine Stimulierung der Produktion von

Anti-Autoantikörpern erfolgt. Hierzu kann beispielsweise das erfindungsgemäße Autoantikörper-Polypeptid einem Patienten verabreicht werden, wodurch die Bildung von antiidiotypischen Antikörpern hervorgerufen oder/und stimuliert wird. Diese Verabreichung kann dabei nach üblichen
5 Immunisierungsprotokollen (Fox et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 279 (1996), 1000-1008; Whittum-Hudson et al., Nat. Med. 2 (1996), 1116-1121; Jardieu, Curr. Opin. Immunol. 7 (1995), 779-782) erfolgen. Andererseits kann die Expression von Antikörpergenen spezifisch durch Verabreichung geeigneter Antisense-Nukleinsäuren gehemmt werden. Das erfindungsgemäße antiidiotypische Antikörper-Polypeptid kann einem Patienten
10 verabreicht werden, um eine direkte Hemmung der Autoantikörper-Aktivität zu erreichen.

Weiterhin wird die Erfindung durch nachfolgende Beispiele, Figuren und
15 Sequenzprotokolle erläutert. Es zeigen:

SEQ ID No. 1 Die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungsgemäßen Antikörpers (Phagemidklon PDG7), wobei
20 Framework-Region (FR)1 von bp 1-90, Komplementbestimmende Region (CDR)1 von bp 91-105, FR2 von bp 106-147, CDR2 von bp 148-195, FR3 von bp 196-291, CDR3 von bp 292-324 und FR4 von bp 325-357 reicht,

25 SEQ ID No. 2 die Aminosäuresequenz zu der in SEQ ID No. 1 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-65, FR3 von A.S. 66-97, CDR3 von A.S. 98-108 und FR4 von A.S. 109-119 reicht,

30 SEQ ID No. 3 die Nukleotidsequenz der L-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon PDG7), wobei FR1

von bp 1-60, CDR1 von bp 61-99, FR2 von bp 100-144, CDR2 von bp 145-165, FR3 von bp 166-261, CDR3 von bp 262-294 und FR4 von bp 295-333 reicht,

5 SEQ ID No. 4 die Aminosäuresequenz zu der in SEQ ID No. 3 angegebenen Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-20, CDR1 von A.S. 21-33, FR2 von A.S. 34-48, CDR2 von A.S. 49-55, FR3 von A.S. 56-87, CDR3 von A.S. 88-98 und FR4 von A.S. 99-11 reicht,

10

SEQ ID No. 5 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon PDG13), wobei FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-109, FR2 von bp 106-147, CDR2 von bp 148-198, FR3 von bp 199-294, CDR3 von bp 295-336 und FR4 von bp 337-369 reicht,

15

SEQ ID No. 6 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 5 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-66, FR3 von A.S. 67-98, CDR3 von A.S. 99-112 und FR4 von A.S. 113-123 reicht,

20

SEQ ID No. 7 die Nukleotidsequenz der L-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon PGD13), wobei FR1 von bp 1-60, CDR1 von bp 61-99, FR2 von bp 100-144, CDR2 von bp 145-165, FR3 von bp 166-261, CDR3 von bp 262-294 und FR4 von bp 295-333 reicht,

25

SEQ ID No. 8 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 7 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-20, CDR1 von A.S. 21-33, FR2 von A.S. 34-48, CDR2 von A.S.

30

49-55, FR3 von A.S. 56-87, CDR3 von A.S. 88-98 und FR4 von A.S. 99-111 reicht,

- 5 SEQ ID No. 9 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungs-
gemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-X16), wobei
FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-105, FR2 von bp
106-147, CDR2 von bp 148-198, FR3 von bp 199-288,
CDR3 von bp 289-336 und FR4 von bp 337-369 reicht,
- 10 SEQ ID No. 10 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 9 dargestell-
ten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30, CDR1
von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S.
50-66, FR3 von A.S. 67-96, CDR3 von A.S. 97-112
und FR4 von A.S. 113-123 reicht,
- 15 SEQ ID No. 11 die Nukleotidsequenz der L-Kette eines erfindungs-
gemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-X16), wobei
FR1 von bp 1 bis 60, CDR1 von bp 61-102, FR2 von bp
103-147, CDR2 von 148-168, FR3 von bp 169-264,
20 CDR3 von 265-291 und FR4 von bp 292-375 reicht,
- 25 SEQ ID No. 12 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 11 darge-
stellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-20,
CDR1 von A.S. 21-34, FR2 von A.S. 35-49, CDR2 von
A.S. 50-56, FR3 von A.S. 57-88, CDR3 von A.S. 89-97
und FR4 von A.S. 89-125 reicht,
- 30 SEQ ID No. 13 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungs-
gemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-X20), wobei
FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-105, FR2 von bp
106-147, CDR2 von bp 148-195, FR3 von bp 196-291,

CDR3 von von bp 292-333 und FR4 von bp 334-366 reicht,

5 SEQ ID No. 14 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 13 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-65, FR3 von A.S. 66-97, CDR3 von A.S. 98-111 und FR4 von A.S. 112-122 reicht,

10 SEQ ID No. 15 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-X39), wobei FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-105, FR2 von bp 106-147, CDR2 von pb 148-198, FR3 von bp 199-294, CDR3 von bp 295-339 und FR4 von 340-372 reicht,

15 SEQ ID No. 16 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 15 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-66, FR3 von A.S. 67-98, CDR3 von A.S. 99-113 und FR4 von A.S. 114-124 reicht,

20 SEQ ID No. 17 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-X40), wobei FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-105, FR2 von bp 106-147, CDR2 von bp 148-198, FR3 von bp 199-297, CDR3 von bp 298-339 und FR4 von bp 340-372 reicht und

25 SEQ ID No. 18 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 17 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1 bis 30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von

30

A.S. 50-66, FR3 von A.S. 67-99, CDR3 von A.S. 100-113 und FR4 von A.S. 114-124 reicht,

Figur 1 die Hemmung der Bindung von Autoantikörper-Phabs (PDG-X)
5 an GPIIb/IIIa durch Zusatz des antiidiotypischen Antikörper-
 Phab AI-X17.

Beispiele

10 1. Identifizierung von Autoantikörpersequenzen

1.1. Gewinnung von Autoantikörpern

Autoantikörper von 12 Patienten mit AITP (8 mit primärer AITP, 3 mit AITP
15 assoziiert mit SLE, 1 mit AITP assoziiert mit Sjögren's Syndrom) wurden
durch Inkubation von Patientenplasma über Nacht mit gereinigtem GPIIb/IIIa
bei 4°C und anschließende Elution in 0,2 mol/l Glycin und 0,15 mol/l NaCl
pH 2,5 für 15 min bei Raumtemperatur erhalten. Nach Zentrifugation für 30
min bei 100.000 g wurde der Überstand mit 1 mol/l Tris-HCl neutralisiert
20 und über Nacht gegen Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) dialysiert.

Zum Zeitpunkt der Plasmaentnahme waren alle Patienten thrombozytopenisch
(Plättchenzahl $< 150 \times 10^9/l$) und hatten normale oder vergrößerte
Megakaryozyten im Knochenmark und waren frei von anderen nachweisbaren
25 Formen der Immunthrombozytopenie.

1.2. Gewinnung gereinigter Antigene

Als Antigene wurden gereinigtes GPIIb/IIIa, ein zytoplasmatisches Fragment
30 von GPIIIa (Aminosäuren 721-744) und ein extrazelluläres Fragment von
GPIIIa (Aminosäuren 468-690) verwendet (Beardsley, Blut 59 (1989), 47-51
und Phillips et al., Methods Enzymol. 215 (1992), 244-263).

1.3. Gewinnung von Plättchen zum Panning und Immunoblotting

Aus EDTA-antikoagulierten Blutproben gesunder humaner Spender wurde Plättchen-angereichertes Plasma durch differenzielle Zentrifugation hergestellt. Die Plättchen wurden durch Zentrifugation bei 2000 g für 15 min isoliert, sechsmal in Zitronensäurepuffer (pH 6,2) mit 50 mmol/l Natriumcitrat, 100 mmol/l NaCl und 125 mmol/l Dextrose gewaschen und schließlich im gleichen Puffer resuspendiert.

Thrombasthenische Plättchen wurden aus einem 14 Jahre alten an Thrombasthenie Glanzmann Typ I erkrankten Jungen unter Verwendung des gleichen Anreicherungsprotokolls erhalten.

1.4. Monoklonale Antikörper

Es wurden murine monoklonale Antikörper verwendet, welche die komplexierte Form von GPIIb/IIIa erkennen, sowie Antikörper, die selektiv GPIIb oder GPIIIa erkennen. Diese Antikörper wurden mit üblichen Immunisierungsprotokollen unter Verwendung der entsprechenden Antigene gewonnen und sind nicht AITP-assoziiert. Die Gewinnung solcher Antikörper ist bei Kouns et al. (J. Biol. Chem. 267 (1992), 18844-18851), Steiner et al. (Biochim. Biophys. Acta 1119 (1992), 12-21) und Häring et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), 4837-4841) beschrieben.

1.5. Phagemid-Bibliothek

Eine kombinatorische Fab-Bibliothek wurde nach der von Vogel et al. (Eur. J. Immunol. 24 (1994), 1200-1207) beschriebenen Methode hergestellt, wobei periphere Blutlymphozyten aus einem gesunden präimmunisierten humanen Spender verwendet wurden. Alle Enzyme und Oligonukleotide wurden von Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland) mit Ausnahme der Taq Polymerase (Perkin Elmer, NJ, USA) bezogen. Die Primer

für die PCR-Amplifikation der H- und L-Ketten der Fab-Moleküle, der VCSM13 Helferphage und der Escherichia coli Stamm XL-Blue wurden von Stratagene (La Jolla, CA, USA) bezogen. Das Phagemid pComb3 wurde vom Scripps Research Institute (La Jolla, CA, USA) bezogen. Die Klonierung, die
5 Transformation in XL-Blue-Zellen und die Herstellung von Phabs erfolgte wie von Barbas III und Lerner, Methods: Companion Methods Enzymol. 2 (1991), 119 beschrieben. Die Phabs wurden mit 4% (w/v) Polyethylenglykol 8000 und 3% (w/v) NaCl präzipitiert und in PBS pH 7,4 resuspendiert. Die resultierende Expressionsbibliothek enthält 1×10^7 Spezifitäten.

10

1.6. Isolierung von GPIIb/IIIa-spezifischen Phabs

GPIIb/IIIa-spezifische Phabs wurden durch insgesamt 5 Runden einer Affinitätsselektion ("Panning") hergestellt. Nach Präabsorption (negative
15 Selektion) mit 5×10^7 thrombasthenischen Plättchen wurden die Phabs mit 10^8 normalen Plättchen für 45 min inkubiert (positive Selektion). Gebundene Phabs wurden dann mit 0,05 mol/l Natriumcitrat pH 2,5 eluiert und mit 1 mol/l Tris-Puffer neutralisiert. Nach jeder "Panning"-Runde wurde die Anreicherung von GPIIb/IIIa spezifischen Phabs durch Titration der
20 Phagenkolonie-bildenden Einheiten verfolgt. Nach fünf Selektionsrunden wurde eine Anreicherung der eluierten Phabs um den Faktor von mehr als 100 gefunden.

Der nach der vierten Selektionsrunde erhaltene Pool von Phabs wurde näher
25 auf seine GPIIb/IIIa Spezifität analysiert. Hierzu wurden 40 Phab-Klone zufällig ausgewählt und ihre Bindespezifität in einem Immunodot-Assay ermittelt. 1 μ l normale und thrombasthenische Plättchen (10^9 ml) sowie gereinigtes GPIIb/IIIa (500 μ g/ml) wurden auf Nitrozellulosestreifen (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) getropft. Die Streifen wurden in TBS mit
30 0,15% Casein (TBS-Casein) blockiert und dann über Nacht mit den in TBS-Casein verdünnten Phabs inkubiert. Nach drei Waschungen mit TBS-0,1% Tween 20 (TBS-Tween) wurden die gebundenen Phabs mit 4-Chlor-1- α -

naphthol (Merck, Darmstadt, Deutschland) nach Inkubation mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem polyklonalem Kaninchen-Anti-Phage-Antikörper (Vogel et al., supra) verdünnt 1:1000 in TBS-Casein nachgewiesen.

5

Die Bindung von Phabs an Plättchen und gereinigtes GPIIb/IIIa wurde auch nach Denaturierung der Proteine durch Erhitzen (70°C) oder durch Säurebehandlung (pH 2 mit 0,5 N HCl) vor dem Auftropfen getestet.

10 Von den 40 zufällig ausgewählten Klonen reagierten 23 (57,5%) mit GPIIb/IIIa, während 17 keine Bindung zeigten. Nach Denaturierung des Antigens durch Hitze oder pH 2 vor der Inkubation wurde keine Bindung von Anti-GPIIb/IIIa an Phabs beobachtet, wodurch gezeigt wird, daß intaktes GPIIb/IIIa für die Phab-Bindung notwendig ist. Fab-Bestimmung an negativen
15 Phabs zeigte keine Fab-Moleküle bei 15 Klonen (88 %). Die zwei Fab-positiven Klone ohne Bindung an GPIIb/IIIa könnten eine geringe Bindeaffinität für GPIIb/IIIa aufweisen.

1.7. Fab Analyse

20

Zum Test der positiven Phabs auf kappa (κ), lambda (λ) und Fd-Ketten wurden die Anti-GPIIb/IIIa Phabs auf Nitrozellulose getropft. Die Filter wurden 4 Stunden lang mit Peroxidase-markiertem Maus-anti-Human- λ -, κ - (The Binding Site Limited, Birmingham, England) und -Fd-Antikörper (aus der
25 Myelomazelllinie HP6045, ATCC1757, Rockville, MD, USA) verdünnt 1:1000 in TBS-Casein inkubiert und mit Chemielumineszenz (ECL, Amersham, Schweiz, Zürich, Schweiz) entwickelt. Ein Test von 15 zufällig ausgewählten Anti-GPIIb/IIIa Fab-Klonen auf κ , λ und Fd-Ketten ergab das Vorhandensein einer Fd-Kette in 12 Klonen (80%) und der λ -Kette in allen
30 Klonen.

Eine quantitative Bestimmung der Fab-Bindung an GPIIb/IIIa auf Plättchen erfolgt durch Präinkubation gepoolter Phabs mit Plättchen in verschiedenen Konzentrationen. Der Überstand wurde dann durch ein Immunodotverfahren analysiert. Dabei wurde festgestellt, daß 1 bis 3×10^4 Phabs pro Plättchen binden. Dies weist darauf hin, daß ungefähr 10 bis 50 % der GPIIb/IIIa Moleküle pro Plättchen durch Phabs besetzt werden können.

1.8. Charakterisierung der Phab-Bindeepitope

Die Epitopspezifität von Phabs wurde durch einen Inhibitionstest unter Verwendung verschiedener monoklonaler Antikörper (siehe Punkt 4) bestimmt. 1 μ l aufgetaute normale und thrombasthenische Plättchen (10^9 /ml), gereinigtes GPIIb/IIIa (500μ g/ml), ein Peptidfragment von GPIIIa (Aminosäuren 468-690, 500μ g/ml) und der cytoplasmatische Abschnitt von GPIIb/IIIa (500μ g/ml) wurden jeweils in Doppelansätzen auf Nitrozellulosestreifen aufgetropft. Nach der Blockierung wurden die Phab-Klone (0,4 μ g/ml Fab) über Nacht mit oder ohne monoklonalen Antikörper (1 μ g/ml) inkubiert. Die gebundenen Phabs wurden durch Peroxidase-markierten Anti-PHage-Antikörper und 4-Chlor-1- α -naphthol nachgewiesen.

Bei diesen Untersuchungen wurden 2 Gruppen von Phabklonen identifiziert. Gruppe A (5 Klone) wurde mäßig durch einen Pool aller Antikörper, aber stark durch GPIIb/IIIa-Komplex-spezifische Antikörper inhibiert. Anti-GPIIb Antikörper hatten keinen Effekt. Gruppe B (10 Klone) wurde vollständig durch den Pool aller Antikörper, aber weniger durch den komplexspezifischen Antikörper und auch durch den IIb spezifischen Antikörper inhibiert. Keine Gruppe zeigte Reaktion mit GPIIIa spezifischen Antikörpern. Gleiche Ergebnisse wurden bei Verwendung von Plättchen oder gereinigtem GPIIb/IIIa als Antigen erhalten. Es wurde keine Phab-Bindung an das cytoplasmatische Peptid oder das extrazelluläre Fragment von GPIIIa gefunden.

Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

Hemmung der Phab-Bindung (Mittelwert \pm SD in %)				
Pools monoklonaler Antikörper für Inhibition	Gruppe A Phab Klone (n = 5)		Gruppe B Phab Klone (n = 10)	
	Plättchen	Gereinigtes GPIIb/IIIa	Plättchen	Gereinigtes GPIIb/IIIa
(1) Anti-GPIIB	0	0	49,1 \pm 5,9	49,4 \pm 9,2
(2) Anti-GPIIIa	0	0	0	0
(3) Anti GPIIb/IIIa-Komplex	77,8 \pm 2,9	43,6 \pm 2,1	58,6 \pm 4,4	45,5 \pm 8,0
Pool aller Antikörper (1)-(3)	47,6 \pm 7,7	33,0 \pm 10,8	95,9 \pm 2,7	97,5 \pm 7,5

1.9. Inhibierungsuntersuchungen

Die Blockierung der Bindung von Autoantikörpern aus Patienten an GPIIb/IIIa durch die gefundenen anti-GPIIb/IIIa Phabs wurde durch Inhibierungsuntersuchungen ermittelt. Hierzu wurden zwei der wie zuvor beschrieben identifizierten Phabklone (PDG16, PDG31) verwendet.

Serielle Verdünnungen von 1:3 bis 1:1000 der eluierten Autoantikörper aus Patienten wurden auf die Bindung an gereinigtes GPIIb/IIIa analysiert. Hierzu wurde ein Immunodotassay durchgeführt. 100 ng gereinigtes GPIIb/IIIa wurde in jeweils dreifachen Ansätzen auf Nitrozellulosestreifen getropft und die Filter mit TBS-Casein blockiert. Zur Blockierung der AITP Autoantikörper-Bindung an GPIIb/IIIa durch Phabs wurden die Streifen 1 h lang mit 10^{11} Phabs und anschließend 4 h lang mit AITP Autoantikörpern in variablen Verdünnungen inkubiert. Gebundene Autoantikörper wurden durch Peroxidase-markierten Anti-human-IgG-Fc Antikörper und ECL nachgewiesen.

Die Bindung von Autoantikörpern aus 8 AITP Patienten wurde durch Anti-GPIIb/IIIa Phabs inhibiert. Der Inhibierungsbereich war 10 bis 46 %, 32 bis 60 % und 20 bis 67 % für PTG16, PTG31 bzw. den Pool der beiden Phabs. Die Bindung von Autoantikörpern aus 4 AITP Patienten wurde durch diese Phabs nicht verändert. In beiden Gruppen waren Autoantikörper von Patienten mit primärer und krankheitsassoziierter AITP.

Eine Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse ist in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2

5

10

15

	Hemmung der Bindung an gereinigtes GPIIb/IIIa durch (%)		
AITP-Patient	Phab-Klon PDG16	Phab-Klon PDG31	Pool beider Phab Klone
WS16	13	19	40
WS37	14	20	36
KC	24	22	28
KK	22	22	40
KP	10	36	60
WS2	25	55	60
KS	60	55	64
KL	0	15	10
KG	0	0	0
KM	0	0	0
KE	0	0	0
KR	0	0	0

1.10. DNA Sequenzanalyse

20

Plasmid DNA wurde aus vier Phabklonen der Gruppe A und 4 Klonen der Gruppe mit dem Nukleobond® AX Reinigungskit PC 20 (Macherey-Nagel AG, Oensingen, Schweiz) gereinigt.

Die Nukleinsäuresequenzierung erfolgte auf einen ABI373A Sequenziersystem unter Verwendung eines PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit. Die Primer wurden von Microsynth, Balgach, Schweiz bezogen. Zur Sequenzierung der H Kette wurden folgende Primer verwendet: Chy1 (5'-CGC TGT GCC CCC AGA GGT-3') und PCH (5'-GGC CGC AAA TTC TAT TTC AAG G-3'). Zur Sequenzierung der L-Kette wurden folgende Primer verwendet: CA (5'-GAG ACA CAC CAG TGT GGC-3'), Ck (5'-CAC AAC AGA GGC AGT TCC-3') und PCL(5'-CTA AAC TAG CTA GTC TCC-3'). Die von der DNA Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden mit der GenEMBL-Genbank verglichen und Stammlinien VH und V λ Familien zugeordnet.

Die VH und V λ Nukleotidsequenzen der 4 Phabklone jeder Gruppe (Gruppe A: PDG7, PDG8, PDG10, PDG16; Gruppe B: PDG13, PDG17, PDG31, PTG37) wurden durch automatisierte Sequenzierung analysiert und mit bekannten Stammlinien-Gensequenzen verglichen (Tabellen 3 und 4). Innerhalb jeder Gruppe war 100 % Homologie in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der H- und L-Ketten. Im Gegensatz dazu war die Homologie zwischen Gruppe A und B nur 36,9 % für die H-Kette und 81,9% für die L-Ketten-Aminosäuresequenzen.

In der H-Kette zeigen Klone der Gruppe A den höchsten Grad an Sequenzidentität mit dem Stammlinien VH4.11 der V μ 4 Familie (Sanz, et al. EMBO J. 8 (1989), 3741-3748). Es gab 7 Aminosäureunterschiede in der Frameworkregion (FR) und 8 in der Komplement-bestimmenden Region (CDR). Klone der Gruppe B unterschieden sich von der am meisten homologen Stammliniensequenz 1.9III der V μ 3-Familie (Berman et al., EMBO J. 7 (1988), 727-738) durch vier Aminosäuren in FR und eine in CDR.

In der L-Kette zeigten die Klone der Gruppe A und B die höchste Homologie zu der Stammliniensequenz der DPL2 der V λ I Familie (Williams und Winter, Eur. J. Immunol. 23 (1993), 1456). Es gab neun Aminosäureun-

terschiede in FR und zehn in CDR für Klone der Gruppe A und einen in FR und zwei in CDR für Klone der Gruppe B. Die erhaltenen Ergebnisse sind in den Tabellen 3 und 4 zusammengefaßt.

Tabelle 3

A. Schwere Ketten

Klone	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VH4.11	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGIS	SYWIS	WIRQPPGKLEWIG	YIYSGSTNYPNPKLS	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	VLPDFDISMDV	WGKGTITVTSS
PDG7	--K-L--	G-S-R	--S--	D-S--K-K--R-	--L--	VLPDFDISMDV	WGKGTITVTSS
PDG8	-----N-----R--	-----	-----	-----	-----N-----	VLPDFDISMDV	WGKGTITVTSS
PDG10	-----	-----	-----	-----	-----	VLPDFDISMDV	WGKGTITVTSS
PDG16	-----	-----	-----	-----	-----	VLPDFDISMDV	WGKGTITVTSS
1.9111	QVQLVESGGGVQPCRSRLRLSCAAGFTES	SYGMH	WVRQAPGKLEWVA	VISYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMHSLRAEDTAVYYCAK	ALGSGWGGWDIHYMDV	WGKGTITVTSS
PDG13	--K-L--	--A--	-----	-----	--A--	ALGSGWGGWDIHYMDV	WGKGTITVTSS
PDG17	-----	-----	-----	-----	-----	ALGSGWGGWDIHYMDV	WGKGTITVTSS
PDG31	-----	-----	-----	-----	-----	ALGSGWGGWDIHYMDV	WGKGTITVTSS
PDG37	-----	-----	-----	-----	-----	ALGSGWGGWDIHYMDV	WGKGTITVTSS
H85255	--Q-V--	-----	-----	-----	--T--	DRPIARWTYGGMDV	WGQGTITVTSS
B. Leichte Ketten							
Klone	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
DPL2	VLTPPPSASGTPGQRTVISC	SGSSNIGSNTVN	WYQQLPGTAPKLLIY	SNNQRPS	GVPDRFSGSKSGTSASLAIISGLQSEDEADYYC	AAMDLSLNG	FGGGTKLTVLSQ ^P
PDG7	-V-----W-----	-----R--P-S	--H-V--	GSH--	-----R-----G-AG--	-T---G---PV	FGGGTKLTVLSQ ^P
PDG8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTVLSQ ^P
PDG10	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTVLSQ ^P
PDG16	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTVLSQ ^P
DPL2	VLTPPPSASGTPGQRTVISC	SGSSNIGSNTVN	WYQQLPGTAPKLLIY	SNNQRPS	GVPDRFSGSKSGTSASLAIISGLQSEDEADYYC	AAMDLSLNG	FGGGTKLTVLSQ ^P
PDG13	-V-----	-----	-----	-----	-----	-----WV	FGGGTKLTVLSQ ^P
PDG17	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTVLSQ ^P
PDG31	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTVLSQ ^P
PDG37	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTVLSQ ^P

FR: framework-Region; CDR: Komplement-bestimmende Region. Die oberen Sequenzen (VH4.11; 1.9111; DPL2) sind zu Vergleichszwecken angegeben und stellen die abgeleitete Aminosäuresequenz für die am nächsten verwandte veröffentlichte Stammlinien-Gensequenz dar. Striche bedeuten Identität. M85255 bezieht sich auf die EMPL/GenBank Kennzeichnungsnummer und bedeutet die abgeleitete Aminosäuresequenz des humanen Anti-GPIIb-Autoantikörpers 2E7 (Kunicki et al., J. Autoimmun. 4 (1991), 433-446). Für die schwere Kette sind die ersten drei Aminosäuren (QVK) durch die Vektorsequenz von pComb3 bestimmt.

Tabelle 4 zeigt die Zuordnung von Klonen der Gruppe A und B zu bekannten Stammlinien V-Gensequenzen nach der Aminosäurehomologie

5		Schwere Kette			Leichte Kette		
	PDG- Phab- Klone	V _H Familie	Stamm- liniengen	Homo- logie (%)	V _L Fa- milie	Stamm- liniengen	Homo- logie (5)
10	Gruppe A: 7,8, 10, 16	V _H 4	V _{H4} .11	84,3	V _L 1	DPL2	81,4
15	Gruppe B: 13, 17,31, 37	V _H 3	1,9III	95,1	V _L 1	DPL2	97,1

2. Identifizierung von antiidiotypischen Antikörpersequenzen

20 Nach der in Beispiel 1 angegebenen Methode wurden durch die Phagemid-
technik Sequenzen für antiidiotypische Antikörper identifiziert. Dabei wurde
der in Beispiel 1 selektionierte Klon PDG16 als Antigen verwendet. Eine
negative Vorselektion fand nicht statt.

25 Es wurde ein Pool von kombinatorischen Phab-Bibliotheken, die Spezifitäten
einer nichtimmunen und einer mit roten Blutzellen immobilisierten Bibliothek
peripherer B-Lymphozyten und einer nichtimmunen Bibliothek von B-
Lymphozyten aus Tonsillen verwendet.

30 Der nach der vierten Panningrunde erhaltene Pool von Phabs wurde
analysiert. Hierzu wurden 40 Phab-Klone zufällig ausgewählt und ihre

Bindespezifität ermittelt. 25 der ausgewählten Klone reagierten mit Anti-GPIIb/IIIa-Phab. Diese antiidiotypischen Phab-Klone gehörten zu zwei Gruppen: Gruppe I (drei Klone) zeigte eine Reaktion ausschließlich mit Autoantikörper-Phab-Klonen der Gruppe A (PDG 7, 8, 10 und 16), während
5 die Phab-Klone der Gruppe II (insgesamt 22 Klone) sowohl mit Phab-Klonen der Gruppen A und B, mit murinen monoklonalen Anti-GPIIb/IIIa-Antikörpern, mit gereinigtem Serumimmunglobulin (IVIgG) oder F(ab')₂ Fragmenten davon und mit Anti-IgE-Fab reagieren. 14 Phab-Klone (Gruppe III) reagierten mit keiner der genannten Substanzen. Ein Phab-Klon der Gruppe IV reagierte nur
10 mit Anti-GPIIb/IIIa Antikörpern. Die Ergebnisse dieser Spezifitätsuntersuchungen sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Eine DNA-Sequenzanalyse von Phab-Klonen der Gruppe I (AI-X16, 17 und 24) zeigte in den für die schwere Kette kodierenden Sequenzen eine bis auf
15 eine Aminosäure in der CDR2 Region vollständige Identität und in den für die leichte Kette kodierenden Sequenzen eine vollständige Identität. Ein Vergleich mit bekannten Stammlinien-Gensequenzen zeigte ca. 85% Homologie zur H-Ketten-Sequenz VH3 und ca. 90% Homologie zur Sequenz der L-Kettenfamilie V- λ II. Von den Phab-Klonen der Gruppen II, III und IV
20 wurde eine DNA-Sequenzanalyse des H-Kettengens jeweils an einem Vertreter durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Sequenzanalyse und des Vergleichs mit bekannten Stammlinien-Gensequenzen ist in den Tabellen 6 und 7 zusammengefaßt.

25 Das Ergebnis einer Inhibitionsuntersuchung ist in Fig. 1 dargestellt. Es wurde gefunden, daß der Phab AI-X17 (Gruppe I) die Bindung von Autoantikörper-Phabs der Gruppe A (PDG-X) an das Glykoprotein IIb/IIIa hemmen kann.

Tabelle 5

Bindung an

AIX	Phab-Klone	PDG A	PDGB	anti-IgE-Fab	anti-GPIIb/IIIa mAb	SG	F(ab') ₂
-----	------------	-------	------	--------------	---------------------	----	---------------------

Gruppe I

16,17,24

3

+

-

-

-

-

-

-

Gruppe II

1,2,3,4,5,6,7,9,

11,13,14,23,26,

27,28,29,33,35,

36,37,38,40

22

+

+

+

+

+

+

+

Gruppe III

8,10,12,15,18,

19,21,22,25,30,

31,32,34,39

14

-

-

-

-

-

-

-

Gruppe IV

20

1

-

-

-

+

+

-

-

Tabelle 7

A. Schwere Ketten

Klone	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
DP47	EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTES	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	AISGSGSTYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	VRDLGYRVLSTFTFDI	WGQGTKVTVSS
AIX16	Q-K-----H-----D	NE---	-----	G--G-LL-H-----	-----N--R--V-----	-----	-----
AIX24	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AIX17	-----	-----	-----	-----N-----	-----	-----	-----
DP49	QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTES	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VISYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	DGRSGSYAREFDGMDV	WGQGTITVTVSS
AIX39	--K-L-----H-----	--T--	-----	L-----	-----A-----K-----	-----	-----
DP31	EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTED	DYAMH	WVRQAPGKGLEWVS	GISWNSGSIYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	MGSSVATYNAFDI	WGQGTITVTVSS
AIX40	Q-K-L-----	--L--	-----	-----D-T-----	-----V-----	-----	-----
DP71	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGIS	SYWMS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYSGSTNYPNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLSSTVTAADTAVYYCAR	DADGDGESPYYEPI	WGQGIPIVSVSS
AIX20	--K-L-----DV--R	--H--	--L-----	F--DGAR-RF-----R--	--SL-M-P-K-----G-----S-----	-----	-----

B. Leichte Ketten

Klone	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
DPL10	QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTSSDVGSYNLVS	WYQQHPGKAPKLMYI	EVSKRPS	GVSNRESGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	CSYAGSSTF	-----
AIX16	VV-----	--AT-N--F-P	-----	-G-----	-----E-----	--VH--N	WVEGGGKTLTVLQGPKAAPSVTLFPPSS
AIX24	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AIX17	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

FR: Framework-Region-; CDK: Komplement-bestimmende Region. Die oberen Sequenzen (DP47, DP49, DP31, DP71 und DPL10) sind zu Vergleichszwecken angegeben und stellen die am nächsten verwandte bekannte Stammliniensequenz dar. Striche bedeuten Identität. Für die schwere Kette sind die ersten drei Aminosäuren (QVD) durch die Vektorsequenz von pComb3 bestimmt.

Tabelle 6

AIX Phab-Klone	H-Kette			L-Kette		
	V _H Familie	Stammlinien- gen	Homologie (%)	V _λ Familie	Stammlinien- gen	Homologie (%)
16, 24	V _H 3	DP47	88%	V _λ 2	DPL10	88%
17	V _H 3	DP47	87%	V _λ 2	DPL10	88%
20	V _H 4	DP71	81%		n.d.	
39	V _H 3	DP49	94%		n.d.	
40	V _H 3	DP31	95%		n.d.	

Ansprüche

1. Nukleinsäure, die für die schwere Kette eines humanen Antikörpers,
5 ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine
CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:
- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
V L P F D P I S M D V (I)
10 kodierenden Nukleotidsequenz,
- (b) einer für die Aminosäuresequenz:
A L G S W G G W D H Y M D V (II)
15 kodierenden Nukleotidsequenz,
- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäurese-
quenz aus (a) oder (b) kodiert und
- 20 (d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIIb/IIIa kodiert.
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, weiterhin umfassend eine CDR1-
Region ausgewählt aus:
- 25 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
G Y S W R (III)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- 30 (b) einer für die Aminosäuresequenz:
S Y A M H (IV)
kodierenden Nukleotidsequenz, und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a), oder (b) kodiert.

5 3. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 oder 2, weiterhin umfassend eine CDR2-Region, ausgewählt aus

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
DISYSGSTKYKPSLRS (V)
10 kodierenden Nukleotidsequenz,

- (b) einer für die Aminosäuresequenz:
VISYDGSNKYYADSVKG (VI)
15 kodierenden Nukleotidsequenz und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

20 4. Nukleinsäure, die für die leichte Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR 3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
25 ATWDDGLNGPV (VII)
kodierenden Nukleotidsequenz,

- (b) einer für die Aminosäuresequenz:
30 AAWDDSLNGWV (VIII)
kodierenden Nukleotidsequenz,

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80 % zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert, und
- 5 (d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIIb/IIIa kodiert.
5. Nukleinsäure nach Anspruch 4, weiterhin umfassend eine CDR1-Region ausgewählt aus:
- 10 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
S G S S S N I R S N P V S (IX)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- 15 (b) einer für die Aminosäuresequenz:
S G S S S N I G S N T V N (X)
kodierenden Nukleotidsequenz, und
- 20 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.
6. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 oder 5, weiterhin umfassend eine CDR2-Region ausgewählt aus:
- 25 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
G S H Q R P S (XI)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- 30 (b) einer für die Aminosäuresequenz:
S N N Q R P S (XIII)
kodierenden Nukleotidsequenz, und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

5 7. Nukleinsäure, die für die schwere Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

10 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
V R D L G Y R V L S T F T F D I (XIV)
kodierenden Nukleotidsequenz,

15 (b) einer für die Aminosäuresequenz:
D G R S G S Y A R F D G M D V (XV)
kodierenden Nukleotidsequenz,

20 (c) einer für die Aminosäuresequenz:
M G S S V V A T Y N A F D I (XVI)
kodierenden Nukleotidsequenz,

(d) einer für die Aminosäuresequenz:
D A D G D G F S P Y Y F P Y (XVII)
kodierenden Nukleotidsequenz,

25 (e) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a), (b), (c) oder (d) kodiert und

30 (f) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Bindefähigkeit an Autoantikörper gegen GPIIb/IIIa kodiert.

8. Nukleinsäure nach Anspruch 7, weiterhin umfassend eine CDR1- oder/und CDR2-Region ausgewählt aus einer für die in Tab. 7 gezeigten Aminosäuresequenzen oder dazu mindestens 80% homologen Aminosäuresequenz kodierenden Nukleotidsequenz.
- 5
9. Nukleinsäure, die für die leichte Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR 3-Region umfaßt, ausgewählt aus:
- 10
- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
C S Y V H S S T N (XVIII)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (b) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
15 einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) kodiert, und
- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer äquivalenten Bindefähigkeit an Autoantikörper gegen
20 GPIIb/IIIa kodiert.
10. Nukleinsäure aus Anspruch 9, weiterhin umfassend eine CDR1- oder/und CDR2-Region ausgewählt aus einer für die in Tab. 7 gezeigten Aminosäuresequenzen oder dazu mindestens 80% homologen Aminosäuresequenz kodierenden Nukleotidsequenz.
- 25
11. Vektor,
dadurch gekennzeichnet,
daß er
- 30 (a) mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder/und mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 bis 6 enthält oder

- (b) mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach Anspruch 7 oder 8 oder/und mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach Anspruch 9 oder 10 enthält.

5 12. Zelle,

dadurch gekennzeichnet,

daß sie

- (a) eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder/und eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 bis 6 oder
10 (b) eine Nukleinsäure nach Anspruch 7 oder 8 oder/und eine Nukleinsäure nach Anspruch 9 oder 10 exprimiert.

13. Polypeptid,

dadurch gekennzeichnet,

15 daß es

- (a) von einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder/und einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 bis 6 oder
(b) von einer Nukleinsäure nach Anspruch 7 oder 8 oder/und einer
20 Nukleinsäure nach Anspruch 9 oder 10 kodiert ist.

14. Polypeptid nach Anspruch 13,

dadurch gekennzeichnet,

daß es die variable Domäne der H-Kette oder/und die variable
25 Domäne der L-Kette eines humanen Antikörpers umfaßt.

15. Polypeptid nach Anspruch 14,

dadurch gekennzeichnet,

daß es sowohl die variable Domäne der H-Kette als auch die variable
30 Domäne der L-Kette umfaßt.

16. Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß es mit einer Markierungsgruppe oder einem Toxin gekoppelt ist.
- 5 17. Antikörper gegen ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 16.
18. Antikörper nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
10 daß er gegen die CDR3-Region der schweren oder/und leichten Antikörperkette des Polypeptids gerichtet ist.
19. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als aktive Komponente eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 10, einen Vektor nach
15 Anspruch 11, eine Zelle nach Anspruch 12, ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 16 oder einen Antikörper nach einem der Ansprüche 17 oder 18, gegebenenfalls zusammen mit anderen aktiven Komponenten sowie pharmazeutisch üblichen Hilfs-, Zusatz- oder Trägerstoffen enthält.
- 20 20. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 10 eines Vektors nach Anspruch 11, einer Zelle nach Anspruch 12, eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 13 bis 16, eines Antikörpers nach Anspruch 17 oder 18 oder einer pharmazeutischen
25 Zusammensetzung nach Anspruch 19 zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose oder für die Behandlung oder Prävention von AITP.

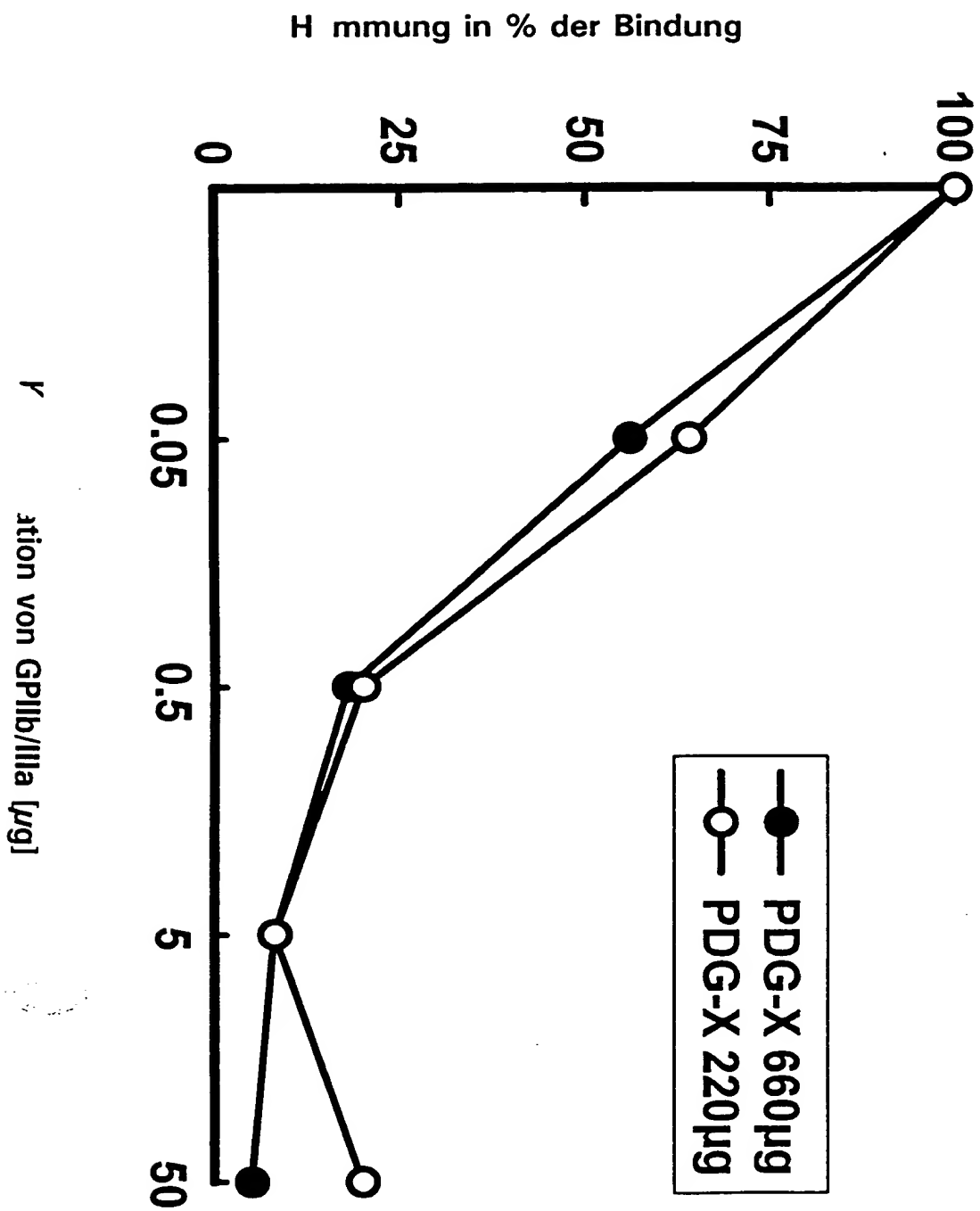
Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft neue Nukleinsäuresequenzen, die für humane
5 Autoantikörper und antiidiotypische Antikörper gegen Blutplättchen-
Membranproteine kodieren, neue Aminosäuresequenzen von humanen
Antikörpern und deren Verwendung für die Diagnostik und Therapie von
Krankheiten.

10

vo 11.12.97 12:53

Fig. 1



SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: ASAT AG Applied Science & Technology
- (B) STRASSE: Baarerstrasse 77
- (C) ORT: Zug
- (E) LAND: CH
- (F) POSTLEITZAHL: 6302

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Rekombinante Antikoerper

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 18

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTR#GER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) L#NGE: 357 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHL#SSEL: CDS
- (B) LAGE:1..357

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GTG	AAA	CTG	CTC	GAG	TCG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TCG	GAG	48	
Gln	Val	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	
1			5				10				15					
ACC	CTG	TCC	CTC	AAC	TGC	ACT	GTC	TCT	GGT	CGC	TCC	ATC	AGT	GGT	TAC	96
Thr	Leu	Ser	Leu	Asn	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Arg	Ser	Ile	Ser	Gly	Tyr	
			20				25				30					
TCT	TGG	AGA	TGG	ATC	CGG	CAG	TCT	CCA	GGG	AAG	GGA	CTA	GAG	TGG	ATT	144
Ser	Trp	Arg	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35				40					45					
GGG	GAT	ATC	TCT	TAT	AGT	GGG	AGT	ACC	AAG	TAC	AAA	CCC	TCC	CTC	AGG	192
Gly	Asp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Lys	Pro	Ser	Leu	Arg	
	50					55					60					
AGT	CGA	GTC	ACC	CTG	TCA	GTA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAG	TTC	TCC	CTG	240
Ser	Arg	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	

65	70	75	80	
AAG CTG AAT TCG GTG ACC GCT GCG GAC ACG GCC GTC TAT TAC TGT GCG				288
Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala				
	85	90	95	
CGA GTC TTG CCC TTT GAC CCG ATC TCG ATG GAC GTC TGG GGC AAA GGG				336
Arg Val Leu Pro Phe Asp Pro Ile Ser Met Asp Val Trp Gly Lys Gly				
	100	105	110	
ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA				357
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser				
	115			

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 119 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu				
1	5	10	15	
Thr Leu Ser Leu Asn Cys Thr Val Ser Gly Arg Ser Ile Ser Gly Tyr				
	20	25	30	
Ser Trp Arg Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile				
	35	40	45	
Gly Asp Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Lys Pro Ser Leu Arg				
	50	55	60	
Arg Val Thr Leu Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu				
	70	75	80	
Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala				
	85	90	95	
Arg Val Leu Pro Phe Asp Pro Ile Ser Met Asp Val Trp Gly Lys Gly				
	100	105	110	
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser				
	115			

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 333 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LÄNGE: 1..333

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GTG	GTG	ACT	CAG	CCA	CCC	TCA	GCG	TCT	GGG	ACC	CCC	GGG	CAG	TGG	GTC	48
Val	Val	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	Trp	Val	
120					125					130					135	
ACC	ATC	TCT	TGT	TCT	GGG	AGC	AGC	TCC	AAC	ATC	AGA	AGT	AAT	CCT	GTT	96
Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Arg	Ser	Asn	Pro	Val	
				140					145					150		
AGC	TGG	TAT	CAC	CAG	GTC	CCA	GGC	ACG	GCC	CCC	AAA	CTC	CTC	ATC	TTT	144
Ser	Trp	Tyr	His	Gln	Val	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Phe	
			155					160					165			
	AGT	CAT	CAG	CGG	CCC	TCA	GGG	GTC	CCT	GAC	CGA	TTC	TCT	GGC	TCC	192
	Ser	His	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	
		170					175					180				
AAG	TCG	GGC	ACC	TCC	GCC	TCC	CTG	GCC	ATC	CGT	GGG	CTC	CAA	TCT	GGG	240
Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Arg	Gly	Leu	Gln	Ser	Gly	
	185					190					195					
GAT	GCT	GGT	GAC	TAT	TAC	TGT	GCA	ACA	TGG	GAT	GAC	GGC	CTC	AAT	GGT	288
Asp	Ala	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr	Trp	Asp	Asp	Gly	Leu	Asn	Gly	
200				205						210					215	
CCG	GTG	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	CTG	ACC	GTC	CTA	AGT	CAG	CCC		333
Pro	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Gln	Pro		
			220					225						230		

ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 111 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Val	Val	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	Trp	Val	
1				5					10					15		
Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Arg	Ser	Asn	Pro	Val	
			20				25						30			
Ser	Trp	Tyr	His	Gln	Val	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Phe	
		35					40					45				
Gly	Ser	His	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	
	50					55					60					

Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Gln Pro
100 105 110

CAG Gln	GTG Val	AAA Lys	CTG Leu 115	CTC Leu	GAG Glu	TCT Ser	GGG Gly	GGA Gly 120	GGC Gly	GTG Val	GTC Val	CAG Gln	CCT Pro 125	GGG Gly	AGG Arg	48
TCC Ser	CTG Leu 130	AGA Arg	CTC Leu	TCC Ser	TGT Cys	GCA Ala	GCC Ala 135	TCT Ser	GGA Gly	TTC Phe	ACC Thr	TTC Phe 140	AGT Ser	AGC Ser	TAT Tyr	96
GCT Ala 145	ATG Met	CAC His	TGG Trp	GTC Val	CGC Arg	CAG Gln 150	GCT Ala	CCA Pro	GGC Gly	AAG Lys	GGG Gly 155	CTG Leu	GAG Glu	TGG Trp	GTG Val	144
ATA Ala 160	ATT Val	ATA Ile	TCA Ser	TAT Tyr	GAT Asp 165	GGA Gly	AGC Ser	AAT Asn	AAA Lys	TAC Tyr 170	TAC Tyr	GCA Ala	GAC Asp	TCC Ser	GTG Val 175	192
AAG Lys	GGC Gly	CGA Arg	TTC Phe	GCC Ala 180	ATC Ile	TCC Ser	AGA Arg	GAC Asp	AAT Asn 185	TCC Ser	AAG Lys	AAC Asn	ACG Thr 190	CTG Leu 190	TAT Tyr	240
CTG Leu	CAA Gln	ATG Met	AAC Asn 195	AGC Ser	CTG Leu	AGA Arg	GCT Ala	GAG Glu 200	GAC Asp	ACG Thr	GCT Ala	GTG Val 205	TAT Tyr 205	TAC Tyr	TGT Cys	288
GCG Ala	AGA Arg	GCG Ala 210	CTG Leu	GGG Gly	AGC Ser	TGG Trp	GGG Gly 215	GGT Gly	TGG Trp	GAC Asp	CAC His	TAC Tyr 220	ATG Met	GAC Asp	GTC Val	336
TGG Trp	GGC Gly 225	AAA Lys	GGG Gly	ACC Thr	ACG Thr	GTC Val 230	ACC Thr	GTC Val	TCC Ser	TCA Ser						369

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 123 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
a Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ala Leu Gly Ser Trp Gly Gly Trp Asp His Tyr Met Asp Val
100 105 110
Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 333 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 1..333

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GTG GTG ACT CAG CCA CCC TCA GCG TCT GGG ACC CCC GGG CAG AGG GTC
Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val
125 130 135
ACC ATC TCT TGT TCT GGA AGC AGC TCC AAC ATC GGA AGT AAT ACT GTA
96

Thr 140	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly 145	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile 150	Gly	Ser	Asn	Thr	Val 155	
AAC	TGG	TAC	CAG	CAG	CTC	CCA	GGA	ACG	GCC	CCC	AAA	CTC	CTC	ATC	TAT	144
Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	
				160					165					170		
AGT	AAT	AAT	CAG	CGG	CCC	TCA	GGG	GTC	CCT	GAC	CGA	TTC	TCT	GGC	TCC	192
Ser	Asn	Asn	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	
			175					180					185			
AAG	TCT	GGC	ACC	TCA	GCC	TCC	CTG	GCC	ATC	AGT	GGG	CTC	CAG	TCT	GAG	240
Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ser	Glu	
		190					195					200				
GAT	GAG	GCT	GAT	TAT	TAC	TGT	GCA	GCA	TGG	GAT	GAC	AGC	CTG	AAT	GGT	288
Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu	Asn	Gly	
	205					210					215					
	GTG	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	CTG	ACC	GTC	CTA	GGT	CAG	CCC		333
	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro		
				225						230						

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 111 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Val 1	Val	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly 10	Thr	Pro	Gly	Gln	Arg	Val 15
	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn	Thr	Val
			20					25					30		
	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
		35					40					45			
Ser	Asn	Asn	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
	50					55					60				
Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ser	Glu
	65				70					75				80	
Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu	Asn	Gly
			85						90				95		
Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro	
		100					105						110		

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 369 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 1..369

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

CAG	GTG	AAA	CTG	CTC	GAG	TCT	GGG	GGA	GGC	TTG	GTT	CAC	CCC	GGG	GGG	48
Gln	Val	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	His	Pro	Gly	Gly	
			115					120					125			
CTC	CTG	AGA	CTC	TCT	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTT	ACG	TTT	GAC	AAC	TTT	96
Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asn	Phe		
		130				135					140					
GCC	ATG	AGC	TGG	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	GTC	144
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
	145					150					155					
TCA	GGC	ATT	AGT	GGT	GGT	GGT	CTT	TTG	ACA	CAC	TAC	GCA	GAC	TCC	GTG	192
Ser	Gly	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Leu	Thr	His	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
160				165						170					175	
AAG	GGC	CGG	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	AAC	AAT	TCC	AGG	AAC	ACT	GTA	TAC	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asn	Asn	Ser	Arg	Asn	Thr	Val	Tyr	
			180					185					190			
CTA	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	GCC	GAA	GAC	ACG	GCC	GTG	TAT	TAT	TGT	288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			195					200				205				
AGA	GAT	CTG	GGC	TAT	AGA	GTA	CTT	TCG	ACT	TTT	ACT	TTT	GAT	ATC		336
Arg	Asp	Leu	Gly	Tyr	Arg	Val	Leu	Ser	Thr	Phe	Thr	Phe	Asp	Ile		
	210					215					220					
TGG	GGC	CAG	GGG	ACA	AAG	GTC	ACC	GTC	TCT	TCA						369
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
	225					230										

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 123 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly

1	5	10	15												
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asn	Phe
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Gly	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Leu	Thr	His	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asn	Asn	Ser	Arg	Asn	Thr	Val	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Val	Arg	Asp	Leu	Gly	Tyr	Arg	Val	Leu	Ser	Thr	Phe	Thr	Phe	Asp	Ile
			100					105					110		
	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
		115					120								

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 375 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 1..375

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

GTG	GTG	ACT	CAG	CCT	GCC	TCC	GTG	TCT	GGG	TCT	CCT	GGA	CAG	TCG	ATC	48
Val	Val	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln	Ser	Ile	
	125					130					135					
ACC	ATC	TCC	TGC	ACT	GGA	ACC	AGC	AGT	GCT	ATT	GGG	AAT	TAT	AAC	TTT	96
Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Ala	Ile	Gly	Asn	Tyr	Asn	Phe	
140					145				150						155	
GTC	CCC	TGG	TAC	CAA	CAG	CAC	CCA	GGC	AAA	GCC	CCC	AAA	CTC	ATG	ATT	144
Val	Pro	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Met	Ile	
				160				165					170			
TAT	GAG	GGC	AGT	AAG	CGG	CCC	TCA	GGG	GTT	TCT	AAT	CGC	TTC	TCT	GGC	192
Tyr	Glu	Gly	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	
			175					180					185			
TCC	AAG	TCT	GGC	AAC	ACG	GCC	TCC	CTG	ACA	ATC	TCT	GGG	CTC	CAG	GCT	240
Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ala	

190					195					200						
GAG	GAC	GAG	GCT	GAG	TAT	TAC	TGC	TGC	TCA	TAT	GTT	CAT	AGT	AGC	ACT	288
Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys	Cys	Ser	Tyr	Val	His	Ser	Ser	Thr	
205					210					215						
AAT	TGG	GTG	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	CTG	ACC	GTC	CTA	GGT	CAG	CCC	336
Asn	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro	
220					225					230					235	
AAG	GCT	GCC	CCC	TCG	GTC	ACT	CTG	TTC	CCA	CCC	TCC	TCT				375
Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser				
240					245											

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 125 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Val	Val	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln	Ser	Ile	
1				5					10					15		
Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Ala	Ile	Gly	Asn	Tyr	Asn	Phe	
			20					25					30			
Val	Pro	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Met	Ile	
		35					40					45				
Tyr	Glu	Gly	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	
	50					55					60					
Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ala		
				70					75					80		
Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys	Cys	Ser	Tyr	Val	His	Ser	Ser	Thr	
				85					90					95		
Asn	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro	
			100					105					110			
Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser				
		115					120					125				

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 366 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: beides

(D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LÄNGE: 1..366

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

CAG	GTG	AAA	CTG	CTC	GAG	TCA	GGA	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCC	TCG	GAG	48
Gln	Val	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	
				130					135						140	
ACC	CTG	TCT	CTC	ACC	TGC	ACT	GTC	TCT	GAT	GTC	TCC	ATC	AGA	AGT	CAT	96
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Asp	Val	Ser	Ile	Arg	Ser	His	
			145					150						155		
TAC	TGG	AGT	TGG	CTC	CGG	CAG	CCC	CCA	GGG	AAG	GGA	CTG	GAG	TGG	ATT	144
Tyr	Trp	Ser	Trp	Leu	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
		160					165					170				
TTT	ATC	TAT	GAC	GGT	GCG	AGA	ACC	AGG	TTC	AAC	CCC	TCC	CTC	AGG		192
Phe	Ile	Tyr	Asp	Gly	Ala	Arg	Thr	Arg	Phe	Asn	Pro	Ser	Leu	Arg		
175					180					185						
AGT	CGA	GTC	TCC	CTT	TCA	ATG	GAC	CCA	TCC	AAG	AAG	CAG	TTT	TCC	CTG	240
Ser	Arg	Val	Ser	Leu	Ser	Met	Asp	Pro	Ser	Lys	Lys	Gln	Phe	Ser	Leu	
190					195					200					205	
AAA	CTG	GGG	TCT	GTG	ACC	GCT	GCG	GAC	TCG	GCC	GTC	TAC	TAC	TGT	GCG	288
Lys	Leu	Gly	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
				210					215					220		
AGA	GAC	GCG	GAT	GGA	GAT	GGC	TTC	AGC	CCA	TAC	TAC	TTT	CCC	TAC	TGG	336
Arg	Asp	Ala	Asp	Gly	Asp	Gly	Phe	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Phe	Pro	Tyr	Trp	
			225					230					235			
GGC	CAG	GGA	ATC	CCG	GTC	TCC	GTC	TCC	TCG							366
Gln	Gly	Ile	Pro	Val	Ser	Val	Ser	Ser								
		240				245										

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 122 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Gln	Val	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	
1				5					10					15		
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Asp	Val	Ser	Ile	Arg	Ser	His	
			20					25					30			
Tyr	Trp	Ser	Trp	Leu	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	

35	40	45
Gly Phe Ile Tyr Asp Gly Ala Arg Thr Arg Phe Asn Pro Ser Leu Arg		
50	55	60
Ser Arg Val Ser Leu Ser Met Asp Pro Ser Lys Lys Gln Phe Ser Leu		
65	70	75
Lys Leu Gly Ser Val Thr Ala Ala Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
	85	90
Arg Asp Ala Asp Gly Asp Gly Phe Ser Pro Tyr Tyr Phe Pro Tyr Trp		
	100	105
Gly Gln Gly Ile Pro Val Ser Val Ser Ser		
115	120	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 372 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄGE: 1..372

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

CAG GTG AAA CTG CTC GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAC CCT GGG AGG	48
Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val His Pro Gly Arg	
125	130
CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT	96
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
140	145
ACT ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG	144
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
155	160
GCA CTT ATA TCA TAT GAT GGA AGC AAT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG	192
Ala Leu Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
	175
AAG GGC CGA TTC GCC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTA TAT	240
Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
	190
CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	205
	210
	215

GCG AAA GAT GGC CGG AGT GGG AGC TAC GCC AGG TTC GAC GGT ATG GAC 336
Ala Lys Asp Gly Arg Ser Gly Ser Tyr Ala Arg Phe Asp Gly Met Asp
220 225 230

GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA 372
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
235 240 245

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 124 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val His Pro Gly Arg
5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Leu Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Lys Asp Gly Arg Ser Gly Ser Tyr Ala Arg Phe Asp Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 372 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: beides
(D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 1..372

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

CAG	GTG	AAA	CTG	CTC	GAG	TCT	GGG	GGA	GGC	TTG	GTA	CAG	CCT	GGC	AGG	48
Gln	Val	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
125					130					135					140	
TCC	CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTT	GAT	GAT	TAT	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr	
				145					150					155		
GCC	CTG	CAC	TGG	GTC	CGT	CAA	GCT	CCA	GGG	AAG	GGC	CTG	GAG	TGG	GTC	144
Ala	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			160					165					170			
TCA	GGT	ATT	AGT	TGG	GAT	AGT	GGT	ACC	ATA	GGC	TAT	GCG	GAC	TCT	GTG	192
Ser	Gly	Ile	Ser	Trp	Asp	Ser	Gly	Thr	Ile	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
		175					180					185				
G	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAC	GCC	AAG	AAC	TCC	CTG	TAT	240
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr		
190					195					200						
CTG	CAA	ATG	AAC	AGT	CTG	AGA	GCT	GAG	GAC	ACG	GCC	TTG	TAT	TAC	TGT	288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys	
205					210					215					220	
GTA	AAA	GAT	ATG	GGG	TCT	TCG	GTA	GTG	GCT	ACG	TAC	AAT	GCT	TTT	GAT	336
Val	Lys	Asp	Met	Gly	Ser	Ser	Val	Val	Ala	Thr	Tyr	Asn	Ala	Phe	Asp	
				225					230					235		
ATC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACA	ATG	GTC	ACC	GTC	TCT	TCA					372
Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
			240					245								

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 124 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Gln	Val	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
1				5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr	
			20					25					30			
Ala	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
Ser	Gly	Ile	Ser	Trp	Asp	Ser	Gly	Thr	Ile	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50				55					60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Lys Asp Met Gly Ser Ser Val Val Ala Thr Tyr Asn Ala Phe Asp
100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

